

## Production massive de précurseurs de globules rouges *in vitro* : vers un nouveau produit sanguin labile ?

Thi My Anh Neildez-Nguyen, Luc Douay

> L'indication majeure de la transfusion des globules rouges est la restauration ou le maintien d'une oxygénation adéquate des tissus chez les patients souffrant d'anémie chronique ou lors d'hémorragies importantes en chirurgie ou en médecine d'urgence. La connaissance des risques de transmission de germes pathogènes (hépatite B dans les années 1960, VIH, HTLV et HTLV-2 dans les années 1980 et hépatite C dans les années 1990) lors de transfusions de sang ou de dérivés sanguins a eu pour effet de réduire le nombre de donneurs potentiels, conséquence d'une sélection médicale accrue. Il reste aussi à définir la transmissibilité éventuelle des agents non conventionnels (ANC) comme les prions par transfusion. Ces risques ont stimulé, à partir des années 1980, le développement de stratégies alternatives. L'érythropoïétine (EPO) n'est généralement pas efficace lorsque la concentration d'érythropoïétine sérique du patient est déjà très élevée, et sa place dans le traitement des anémies chroniques (en dehors de celles qui accompagnent les insuffisances rénales chroniques) (→) n'est pas encore parfaitement définie. Une stratégie de transfusion sanguine autologue, notamment lors d'interventions chirurgicales programmées, a été utilisée à partir des années 1980. Des « substituts du sang », comme des transporteurs d'oxygène

artificiels à base d'hémoglobine (Hb) ou des tentatives de production d'hémoglobine recombinante ont été proposés. Ces produits pourraient servir de relais, mais ne concurrencent en rien la transfusion sanguine. De plus, certains problèmes liés à leur utilisation subsistent [1, 2] comme l'auto-oxydation de l'hémoglobine en solution, ou l'effet vasoconstricteur des solutions d'hémoglobine. Il serait dès lors intéressant de trouver d'autres sources possibles de globules rouges. Le récent développement des techniques de sélection des progéniteurs hématopoïétiques immatures, et notre connaissance des facteurs de croissance ciblant spécifiquement certaines lignées cellulaires, rendent envisageable la production *ex vivo* de populations cellulaires hématopoïétiques à des fins de greffe (progéniteurs ou cellules souches) ou à des fins transfusionnelles (globules blancs ou précurseurs érythroïdes). Ces cellules peuvent être amplifiées à partir de la prolifération d'un tout petit nombre de cellules souches sanguines, médullaires ou placentaires. Le sang de la veine du cordon ombilical présente certains avantages par rapport aux deux autres sources : il est particulièrement riche en progéniteurs immatures. En effet, le sang prélevé d'un seul cordon contient suffisamment de progéniteurs hématopoïétiques [3] pour permettre une prise de greffe chez l'enfant [4, 5] et parfois

Inserm U.417,  
Hôpital Saint-Antoine,  
184, rue du Faubourg  
Saint-Antoine,  
75571 Paris Cedex 12,  
France et Service  
d'hématologie  
biologique, Hôpital  
Trousseau, 26, avenue du  
Docteur Arnold Netter,  
75012 Paris, France.  
[luc.douay@trs.ap-hop-paris.fr](mailto:luc.douay@trs.ap-hop-paris.fr)

chez l'adulte [6].  
De plus, ces pro-  
géniteurs don-  
nent naissance  
*in vitro* à des  
colonies de plus  
grande taille [7]

et ont une capacité d'expansion plus importante [8] que ceux qui sont issus du sang périphérique adulte ou de la moelle osseuse adulte.

Une littérature abondante montre que la différenciation de cellules souches hématopoïétiques (CSH), notamment dans les lignées érythroïdes et granulées, peut être stimulée très efficacement en culture par différentes combinaisons de cytokines. Dexter *et al.* [9] ont été les premiers à faire état d'une possible différenciation érythroïde dans un système de culture murin à long terme. Plus récemment, Malik *et al.* [10] ont développé un modèle de production d'érythrocytes humains chez les sujets drépanocytaires à partir de CSH de sang de cordon, de moelle osseuse et de sang périphérique. Freyssinier *et al.* [11] ont proposé un protocole expérimental intéressant, mais en plusieurs étapes complexes de purification et d'amplification, permettant la prolifération en grand nombre d'une population pure de progéniteurs érythroïdes à partir de sang de cordon ou de sang périphérique. Tirant profit de l'expérience acquise en matière de contrôle de la prolifération et de la différenciation des cellules hématopoïétiques [12-16], notre équipe a développé un protocole d'amplification *in vitro*, à grande échelle, de précurseurs d'érythrocytes à partir de CSH de sang de



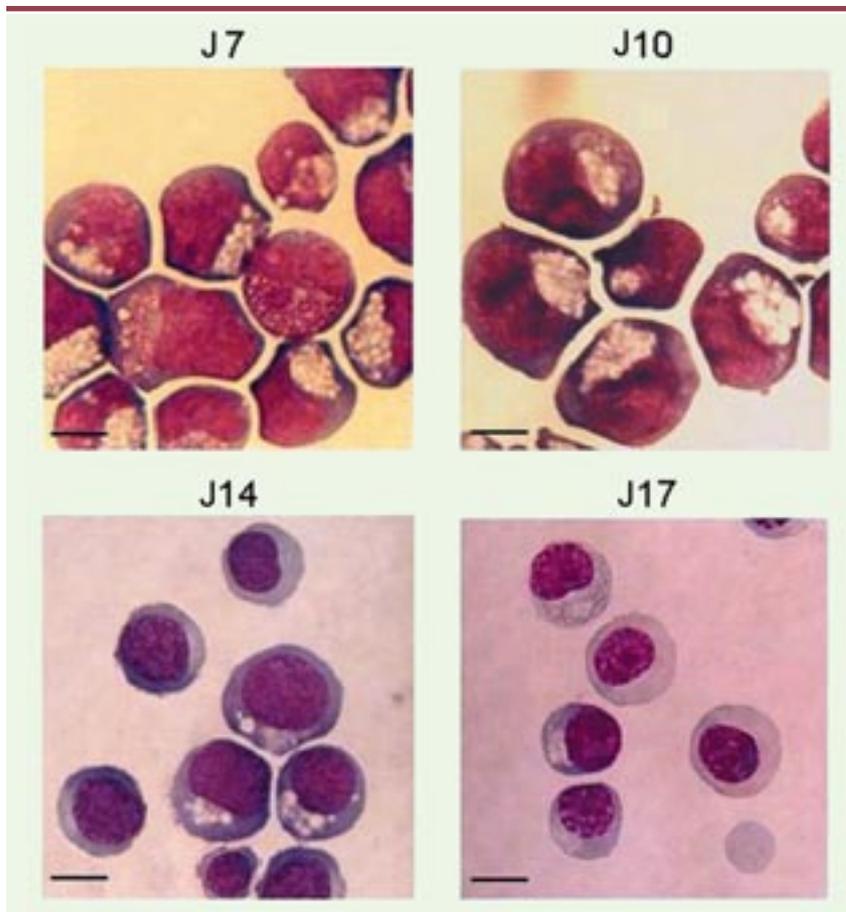
(→) m/s  
2002, n°5,  
p. 540

cordon exprimant l'antigène CD34 [17], en collaboration avec H. Wajcman (Inserm U.468, Hôpital Henri Mondor, Créteil, France), M.C. Marden (Inserm U.473, Hôpital de Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France), M. Bensidhoum et D. Thierry (DPHD, Saram, IPSN, Fontenay-aux-Roses, France). Les cellules ont été cultivées dans un milieu défini, selon un protocole d'amplification en trois étapes : une première étape du jour 0 au jour 7, en présence de trois cytokines, *stem cell factor* (SCF), ligand de Flt3 et thrombopoïétine, choisies parce qu'elles entraînent la prolifération des cellules souches primitives, suivie d'une seconde étape à nouveau de 7 jours, en présence d'EPO, d'IGF-I (*insulin-like growth factor-1*) et de SCF, cytokines ciblant les progéniteurs érythroïdes, puis d'une troisième étape à partir de J15, en présence d'EPO et d'IGF-I, actives sur la différenciation des précurseurs érythroïdes. Après 17 jours de culture, l'augmentation du nombre de cellules par rapport à J0 atteint en moyenne 200 000 fois (50 000 à 280 000), dont 96% sont des précurseurs érythroblastiques et 4% des réticulocytes (Figure 1). Ces conditions de culture amplifient sélectivement le compartiment des progéniteurs érythroïdes en début de culture, comme en témoigne le pic du nombre de progéniteurs érythroïdes (CFU-É,

*colony-forming unit-erythroid*) à J10, nombre qui diminue progressivement jusqu'à devenir indétectable à J17. Dans de telles conditions d'amplification, lorsque la culture est établie à partir de  $10^6$  cellules CD34<sup>+</sup> de sang de cordon, la production d'hémoglobine atteint 45 g. Cette Hb est majoritairement de type fœtal et parfaitement fonctionnelle en ce qui concerne la fixation et le relargage de l'oxygène.

Cependant, ces cellules sont incapables, *in vitro*, de poursuivre leur maturation jusqu'à la production de globules rouges énucléés. Nous avons donc étudié le devenir de ces populations après leur transfusion *in vivo* chez des souris immunodéficientes NOD/SCID (*non-obese diabetic severe combined immunodeficient*), modèle animal utilisé classiquement pour l'analyse de la reconstitution *in vivo* de CSH humaines. Nous avons choisi de greffer les cellules obtenues au jour 10 de la culture, qui

sont composées de 93 % de précurseurs érythroïdes et ont encore une forte capacité de prolifération comme en témoigne leur richesse en CFU-É. Trente millions de ces cellules, incubées au préalable avec un marqueur fluorescent CFSE (*carboxy fluorescein succinimidyl ester*), ont été transfusées à des souris NOD/SCID irradiées de manière sublétales. On a alors observé les faits suivants : (1) les cellules CFSE<sup>+</sup> étaient détectables dans le foie, la rate, la moelle, les poumons et le sang des animaux, sans être détruites ; (2) dans le sang, elles achevaient en 4 jours leur maturation terminale complète jusqu'au stade de globule rouge énucléé, maturation qui s'accompagnait d'une prolifération aboutissant à une amplification du nombre de cellules d'environ 100 fois ; (3) les cellules CFSE<sup>+</sup> énucléées sont bien des globules rouges exprimant l'antigène D du système Rhésus comme le sang de cordon dont les CD34<sup>+</sup> initiales étaient issues ;



**Figure 1. Morphologie des cellules amplifiées en culture.** La différenciation érythroïde est évidente dès 7 jours de culture (70 % de cellules érythroïdes) et, à partir de J10, plus de 90 % des cellules sont de type érythroïde à un stade prédominant de pro-érythroblaste. L'érythropoïèse progresse en fonction du temps de culture et, à J17, nous obtenons 64 % d'érythroblastos basophiles, 31 % d'érythroblastos polychromatophiles et acidophiles et 4 % de cellules énucléées (barre = 10 µm).



(4) l'Hb contenue dans ces globules rouges était majoritairement de type adulte ( $\alpha_2\beta_2$ ) et parfaitement fonctionnelle (Figure 2).

Nous avons confirmé l'intérêt transfusionnel de cette population de précurseurs érythroïdes en établissant les caractéristiques suivantes : il n'existe pas d'amplification concomitante des cellules maternelles contaminantes, les cellules lymphocytaires B CD19<sup>+</sup> ou T CD3<sup>+</sup> sont indétectables (< 0,1 %) ; seuls de très faibles niveaux de molécules HLA de classe I et de HLA-DR sont exprimés par un petit pourcentage de cellules (1,4 et 3,4 % respectivement) ; avantage supplémentaire, les précurseurs obtenus à J10 supportent la congélation et ne perdent pas leur capacité proliférative. L'estimation quantitative des niveaux de production permet d'envisager une utilisation clinique de ces cellules. En effet : (1)  $10^6$  cellules CD34<sup>+</sup> (correspondant au 1/4 ou au 1/3 du contenu en sang recueilli de la veine ombilicale d'un cordon standard) peuvent engendrer  $5$  à  $10 \times 10^9$  précurseurs érythroïdes qui continueront ensuite leur amplification et leur différenciation *in vivo* après transfusion jusqu'à un total de  $5$  à  $10 \times 10^{11}$  globules rouges, soit 3 à 5 fois la quantité quotidienne normale produite chez l'homme ; (2) la transfusion de

précurseurs érythroïdes produits *ex vivo* à partir de cellules CD34<sup>+</sup> de sang placentaire pourrait permettre d'apporter un support transfusionnel comparable à celui des concentrés standards de globules rouges (CG). En effet si l'on considère qu'un CG contient en moyenne  $2 \times 10^{12}$  globules rouges et qu'il augmente en moyenne le taux d'hémoglobine de 1g chez le receveur, on peut estimer à 1 à  $2 \times 10^{10}$  le nombre de précurseurs érythrocytaires à transfuser pour obtenir une élévation de 0,5 à 1 g d'Hb chez le receveur ; (3) la production de plusieurs unités de globules rouges à partir d'un seul sang de cordon réduirait les risques de contamination par des virus ou des agents non conventionnels (voir plus haut) ; (4) le sang de cordon est une source facilement disponible de CSH. Ce travail propose donc une nouvelle technologie de production à grande échelle de cellules érythroïdes ayant un intérêt transfusionnel potentiel, dans la mesure où nous montrons pour la première fois que des précurseurs érythroïdes produits *ex vivo* en grande quantité conservent leur capacité de terminer leur maturation *in vivo* jusqu'au stade de globules rouges mûrs contenant de l'hémoglobine adulte fonctionnelle. Si ces résultats sont confirmés chez l'homme, c'est-à-dire si ces précurseurs

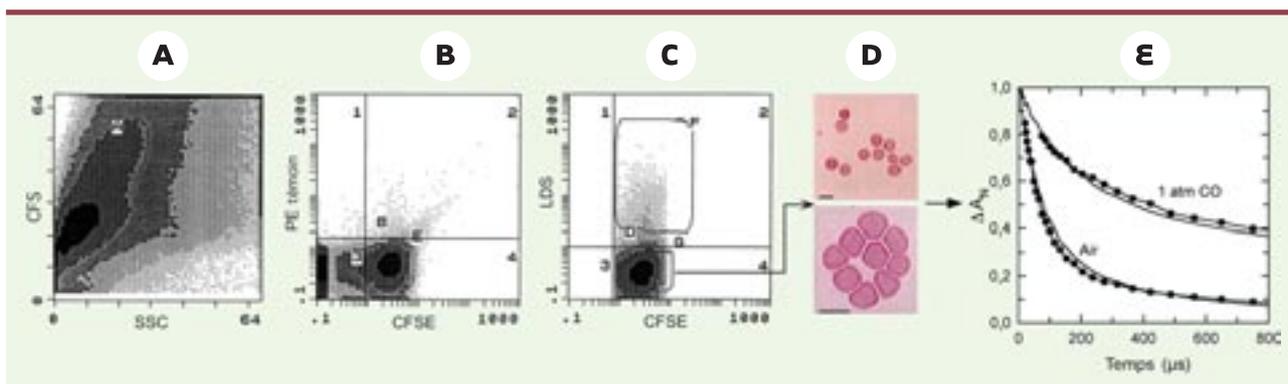
érythroïdes nucléés ne sont pas détruits dans la rate ou dans le foie des receveurs, on pourra alors envisager la constitution de banques de sang de cordon pour la production de globules rouges de phénotypes particuliers. Il existe en effet en médecine transfusionnelle des situations d'impasse dues à la non-disponibilité d'unités érythrocytaires compatibles.

L'intérêt potentiel de la transfusion de précurseurs érythroblastiques se situe à plusieurs niveaux.

- Sur le plan de l'efficacité transfusionnelle, l'injection de cellules qui donneront naissance en quelques jours à une population de globules rouges homogènes en âge peut améliorer significativement le rythme transfusionnel et diminuer à terme la surcharge martiale des polytransfusés en réduisant le nombre de transfusions.

- Sur le plan de la sécurité transfusionnelle, le sang placentaire est à l'évidence privilégié car c'est le moins susceptible aux contaminations virales ou aux agents non conventionnels, comparé aux produits transfusionnels actuellement disponibles.

- Sur le plan des indications transfusionnelles, on peut raisonnablement envisager la constitution de banques de sang placentaire de phénotypes rares.



**Figure 2. Maturation terminale des précurseurs érythroïdes humains transfusés.** Les cellules CFSE<sup>+</sup> circulantes du sang périphérique des souris *nod/scid*, négatives au LDS (colorant vital des acides nucléiques), représentatives des globules rouges (GR) énucléés humains qui auraient mûri *in vivo* à partir des précurseurs érythroïdes transfusés, ont été triées à J3 et à J7 après injection (C). L'analyse morphologique des cellules CFSE<sup>+</sup>/LDS<sup>-</sup> triées montre des globules rouges énucléés (D) (photos, barre = 10 µm). Par la technique de photo-dissociation par éclair laser, nous montrons que l'hémoglobine (Hb) contenue dans ces globules rouges est fonctionnelle (E) puisqu'elle présente une cinétique de recombinaison à l'O<sub>2</sub> et au monoxyde de carbone (CO) similaire à celle de l'Hb adulte issue de sang périphérique, utilisée comme témoin (courbes pointillées).

• Sur le plan de la prospective, cette phase est un préalable indispensable à un développement futur à partir de cellules souches périphériques pour des applications autologues.

Il ne s'agit pas ici de proposer une alternative à la transfusion classique, mais une approche complémentaire dont il importe maintenant d'évaluer la faisabilité et l'intérêt transfusionnel pour des débouchés thérapeutiques ultérieurs potentiellement considérables. ♦

**Large scale production of erythroid precursors by ex vivo expansion of cord blood hematopoietic stem cells : towards a new labile blood product**

**RÉFÉRENCES**

1. Pagnier J, Marden M, Poyard C. Le point sur les transporteurs d'oxygène à base d'hémoglobine. *Med Sci* 1996 ; 12 : 1342-50.
2. Winslow RM. Les substituts de globules rouges : nouvelles solutions pour de vieux problèmes. *Hématologie* 1998 ; 4 : 267-76.
3. Broxmeyer HE, Hangoc G, Cooper S. Growth characteristics and expansion of

human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 4109-13.

4. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989 ; 321 : 1174-8.a
5. Kurtzberg J, Laughlin M, Graham ML, et al. Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N Engl J Med* 1996 ; 335 : 157-66.
6. Laporte JP, Gorin NC, Rubinstein P, et al. Cord-blood transplantation from an unrelated donor in an adult with chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 1996 ; 335 : 167-70.
7. Broxmeyer HE, Carow C, Hangoc G, Hendrie PC, Cooper S. Hematopoietic stem and progenitor cells in human umbilical cord blood. *Hum Gene Transfer* 1991 ; 219 : 95-102.
8. Mayani H, Dragowska W, Lansdorp PM. Cytokine-

induced selective expansion and maturation of erythroid versus myeloid progenitors from purified cord blood precursor cells. *Blood* 1993 ; 8 : 3252-8.

9. Dexter TM, Testa NG, Allen TD, Rutherford T, Scolnick, E. Molecular and cell biologic aspects of erythropoiesis in long term bone marrow cultures. *Blood* 1991 ; 58 : 699-706.
10. Malik P, Fisher TC, Barsky LL, et al. An *in vitro* model of human red blood cell production from hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1998 ; 91 : 2664-71.
11. Freyssonier JM, Lecoq-Lafon C, Amsellem S, et al. Purification, amplification and characterization of a population of human erythroid progenitors. *Br J Haematol* 1999 ; 106 : 912-22.
12. Douay L. Experimental culture conditions are critical for *ex vivo* expansion of hematopoietic cells. *J Haematother Stem Cell Res* 2001 ; 10 : 341-6.
13. Giarratana MC, Vergé V, Schmitt C, et al. Presence of primitive lymphoid progenitor with NK or B potential in

*ex vivo* expanded bone marrow cell cultures. *Exp Hematol* 2000 ; 28 : 46-54.

14. Kobari L, Giarratana MC, Firat H, et al. The respective role of EPO, G-CSF, FL and MGDF in presence of SCF, IL-3 and IL-6 for *ex vivo* expansion of hematopoietic cell compartments. *Bone Marrow Transpl* 1998 ; 21 : 759-67.
15. Kobari L, Pflumio F, Giarratana MC, et al. *In vitro* and *in vivo* evidences for the long-term multilineage (myeloid, B, NK and T) reconstitution capacity of *ex vivo* expanded human CD34+ cord blood cells. *Exp Hematol* 2001 ; 28 : 1470-80.
16. Giarratana MC, Kobari L, Neildez-Nguyen TMA, et al. Cell culture bags allow high extent of *ex vivo* expansion of LTCIC and functional mature cells which can subsequently be frozen: interest for large scale clinical applications. *Bone Marrow Transpl* 1998 ; 22 : 707-715.
17. Neildez-Nguyen TMA, Wajcman H, Marden MC, et al. Large scale *ex vivo* production of immature human erythroid cells for transfusion. *Nat Biotech* 2002 ; 20 : 467-72.